

論文の内容の要旨

論文題目：チトクロム P450 系における電子伝達相互作用の
蛋白質回転運動による解析

論文提出者氏名：山田 慎

チトクロム P450 は様々な臓器に存在して、ステロイドホルモンの生合成や薬物代謝(解毒)など重要な役割を果たしている。本研究においては、P450_{scc} 及び P450_{1A2} (ラビット)、P450_{1A1} (ラット) を用いた。P450_{scc} は副腎皮質ミトコンドリアに存在し、コレステロールの側鎖を切断してプレグネノロンに変換する。コレステロールが全てのステロイドホルモンの共通の基質であるため、この側鎖切断反応が必須の反応であり、かつ律則反応でもあるため、この反応は非常に重要である。また、P450_{1A2}、P450_{1A1} は化学発癌物質、メチルコラントレンで肝臓ミクロソームに誘導される P450 である。P450 が関与する反応は基質に一酸素を添加するモノオキシゲナーゼ反応で、この反応に際して P450 は酸素と 2 電子が必要となる。この電子伝達経路はミトコンドリア、ミクロソームで異なっている。ミトコンドリアでは NADPH からアドレノドキシン還元酵素 (ADR)、アドレノドキシン (ADX) を介して P450 へと伝達され、ミクロソームでは NADPH から NADPH-チトクロム P450 還元酵素を介して P450 へという経路と NADH から NADH-チトクロム b₅ 還元酵素、チトクロム b₅ を介して P450 へという経路の 2 つがある。しかし、P450 還元酵素から P450 への電子伝達経路は第一電子、第二電子のどちらも伝達できるのに対し、チトクロム b₅ から P450 への経路は第二電子のみしか伝達できないという違いもある。ミトコンドリア型においてもミクロソーム型においても、これまでの研究は、P450 が膜内在性の蛋白質であるにも関わらず、その測定が多くが溶液中か膜-蛋白質系を壊して行ったものであり、これは P450 が実際に生体内で機能している環境とは大きく異なっている。P450 系蛋白質の電子伝達相互作用について、疎水性相互作用が重要であるという報告もあり、脂質二重膜中での測定は膜蛋白質間の相互作用を理解する上で欠くことのできないものである。それにも関わらず、これまでの研究が殆ど溶液中での測定であるのは、P450 が不安定な蛋白質であり脂質膜への再構成が難しいことやスペクトル測定、カラムや架橋剤を用いた測定では脂質膜中での測定が困難であることに因る。

そこで、本研究では、脂質膜中において蛋白質間相互作用の測定が可能なた

間分解偏光解消法（時間分解蛋白質回転拡散測定法）を用いて、非侵襲的に蛋白質の運動を直接捉え、P450 と P450 への電子伝達に関与している蛋白質との電子伝達相互作用を調べた。この時間分解偏光解消法は、ミリ秒以下の非常に短寿命の会合体でも検出ができるという特徴を有する。また、P450 系タンパク質のみを脂質膜中に再構成することでより厳密なタンパク質間相互作用の解析を可能とした。

ミトコンドリア型の電子伝達を行う P450_{scc} はミトコンドリア膜の主要脂質である、フォスファチジルコリン、フォルファチジルエタノールアミン、カルジオリピン（4:4:1 (W/W)）で構成した脂質膜中にコール酸透析法により、脂質/P450=2 で再構成した。リポソーム調製の過程において P450_{scc} は変性することなく、また、プロテオリポソームはショ糖密度勾配遠心で単一のバンドを示し、十分なコレステロール（基質）代謝活性も保持していた。ADX, ADR は内在性のプローブを持たないため、回転運動測定ができるよう、これらの蛋白質をリン光色素、エリスロシンで標識を行った。ADX に関して、リジン残基は P450_{scc} 及び ADR との相互作用に関与していないという報告に基づき、ADX はエリスロシン-イソチオシアネートで標識を行い、ADR に関しては、リジン残基が ADX との相互作用に必須であるという報告があるため、エリスロシン-ヨードアセトアミドを用いて、リジン残基ではなくシステイン残基を標識し、80%以上の ADX, ADR がエリスロシンで標識された。また、この標識により ADR から ADX を介した P450_{scc} への電子伝達の障害は見られなかった。P450_{scc} リポソームに ADX, ADR を加えた、P450_{scc}+ADX+ADR 系（1:1:1 (mol/mol)）、及びこの系に抗 P450_{scc} 抗体を加えて特異的に P450_{scc} を凝集させた、P450_{scc}+ADX+ADR+抗 P450_{scc} 抗体系（1:1:1:3 (mol/mol)）で ADX, ADR の回転拡散運動を時間分解測定した。その結果、抗 P450_{scc} 抗体を加えることで、ADR, ADX のリン光異方性 $r(t)$ の減衰は浅くなった。この $r(t)$ を

$$r(t) = r(0)[\beta_1 \exp(-t/\phi_1) + \beta_2 \exp(-t/\phi_2)]$$

（但し、 β_1, β_2 は定数であり、 $\phi_1 \leq \phi_2$ である）

に基づき解析を行うと、ADR の $r(t)$ から、抗 P450_{scc} 抗体を加える前は、 $\phi_1=35 \pm 3 \mu\text{s}$, $\phi_2=1043 \pm 74 \mu\text{s}$, $\beta_1=0.51 \pm 0.03$, $\beta_2=0.49 \pm 0.03$, 抗 P450_{scc} 抗体を加えた後は、 $\phi_1=31 \pm 6 \mu\text{s}$, $\phi_2=3297 \pm 1609 \mu\text{s}$, $\beta_1=0.42 \pm 0.01$, $\beta_2=0.59 \pm 0.01$, ADX の $r(t)$ から、抗 P450_{scc} 抗体を加える前は、 $\phi_1=37 \pm 3 \mu\text{s}$, $\phi_2=778 \pm 24 \mu\text{s}$, $\beta_1=0.46 \pm 0.02$, $\beta_2=0.54 \pm 0.02$, 抗 P450_{scc} 抗体を加えた後は、 $\phi_1=32 \pm 2 \mu\text{s}$, $\phi_2=1212 \pm 29 \mu\text{s}$, $\beta_1=0.39 \pm 0.02$, $\beta_2=0.61 \pm 0.02$ となった。P450 の凝集による ADR, ADX の運動性の減少は、P450_{scc}-ADX-ADR の 3 者会合体の形成を示しており、これによって、P450_{scc}-ADX-ADR の形成が明らかとなった。しかし、3 者会合体はカ

ラムクロマトグラフィーや架橋剤による架橋反応等の生化学的手法では殆ど検出できていないことから、その寿命は非常に短いものであろう。つまり、本研究において検出された会合体は、これまでに提唱されてきた安定した会合体とは全く異なり、ミリ秒程度の寿命を持つ新しい P450_{scc}-ADX-ADR 3 者会合体であり、その割合は、10-12%と見積もられた。

ミクロソーム型の電子伝達を行う P4501A2 はミクロソーム膜の主要脂質である、フォスファチジルコリン、フォルファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン (10:5:1 (W/W)) で構成した脂質膜中にコール酸透析法により、脂質/P450=2 で再構成した。これらのプロテオリポソームをショ糖密度勾配遠心で単一のバンドを示し、ベンツピレン (基質) 水酸化活性、チトクロム c 還元活性とも高い活性を示し、P4501A2 と P450 還元酵素は同一のリポソーム中に再構成されていることが確認された。P4501A2 とチトクロム b5 が同一のリポソーム中に再構成されていることはスペクトル測定により確認した。P4501A2 のみを再構成した系、還元酵素を加えた P4501A2+還元酵素系 (1:1 (mol/mol))、チトクロム b5 を加えた P4501A2+チトクロム b5 系 (1:1 (mol/mol)) で、P4501A2 の回転拡散運動を時間分解測定した。その結果、P450 還元酵素、チトクロム b5 を加えると、P4501A2 のみの時と比べて、異方性 $r(t)$ の減衰は深くなった。この $r(t)$ を

$$r(t) = r(0) \left[\beta_1 \exp(-t/\phi) + \beta_2 \exp(-4t/\phi) + \frac{r_3}{r(0)} \right] \quad (1)$$

(但し、 β_1, β_2, r_3 は定数である)

で解析すると、P4501A2 のみを再構成した系では、 $\phi=237 \pm 55 \mu\text{s}$, $r_3/r(0)=0.23 \pm 0.04$, P4501A2+P450 還元酵素系では、 $\phi=299 \pm 40 \mu\text{s}$, $r_3/r(0)=0.15 \pm 0.04$, P4501A2+チトクロム b5 系では、 $\phi=249 \pm 27 \mu\text{s}$, $r_3/r(0)=0.08 \pm 0.15$ であった。残留異方性 $r_3/r(0)$ から運動している割合を見積もることができ、P4501A2 のみの系と比べて、還元酵素を加えた場合は 80% から 89% へ 9%, チトクロム b5 を加えた場合は 96% へ 16%, 運動している P450 の割合が増加した。この運動性の上昇は、還元酵素やチトクロム b5 が P4501A2 と会合体を形成し、この測定時間領域で静止して見える大きな会合体から解離して運動できるようになったためと解釈でき、これによって、P4501A2 は P450 還元酵素やチトクロム b5 と会合体を形成することが明らかとなった。

ラットでは、化学発癌物質、メチルコラントレンで P4501A1 及び P4501A2 が誘導される。この 2 つの P450 は精製過程で完全に分離することは不可能で、精

製蛋白質を用いてプロテオリポソームを再構成しても P4501A1 のみの回転運動測定は不可能であったが、酵母マイクロソームへの P4501A1 の遺伝子発現が成功し、P4501A1 のみの回転運動測定が可能となった。そこで、P4501A1, P4501A1 と P450 還元酵素との共発現系, P4501A1 と還元酵素との融合酵素発現系において、P4501A1 (融合酵素) のマイクロソーム膜中における回転拡散運動を時間分解測定した。その結果、共発現系, 融合酵素系では、P4501A1 のみを発現した時と比べて、異方性 $r(t)$ の減衰は深くなった。また、共発現系と融合酵素系では $r(t)$ に有意な差は見られなかった。この $r(t)$ を(1)式で解析すると、P4501A1 のみを発現した系では $\phi=1180 \pm 230 \mu\text{s}$, $r_3/r(0)=0.73 \pm 0.04$, 共発現系では $\phi=1300 \pm 250 \mu\text{s}$, $r_3/r(0)=0.59 \pm 0.04$, 融合酵素系では $\phi=1350 \pm 240 \mu\text{s}$, $r_3/r(0)=0.61 \pm 0.04$ であった。残留異方性 $r_3/r(0)$ から運動している P4501A1 (融合酵素) 割合を見積もると、P4501A1 のみを発現させた系と比べて、共発現系では、28%から 42% ~ 14%運動している P450 の割合が増加した。この運動性の上昇は還元酵素が P4501A1 と会合体を形成し、この測定時間領域で静止して見える大きな会合体から解離して運動できるようになったためと解釈できる。また、共発現系における P4501A1 の運動性と寿命 ∞ の安定な P4501A1-P450 還元酵素複合体である融合酵素の運動性間に有意な差が見られないということもこの解釈の妥当性を示している。